[1]产酸丙酸杆菌耐酸菌株的选育及其应用

孙丹，徐国霞，王自强，王云山，张利平，苏志国

(1 河北大学生命科学学院，河北 保定 071002；2 中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室，北京 100190)

摘　要：为了解除微生物发酵生产丙酸过程中代谢产物（丙酸）对菌体生长的抑制作用，以实验室保藏的产酸丙酸杆菌（耐 30g/L 丙酸）为出发菌株 P-0，通过丙酸压力筛选获得了一株耐 10g/L 丙酸的产酸性能良好的菌株 P-10，降低了发酵过程中丙酸对菌体生长的抑制作用。菌株 P-10 做摇瓶发酵，发酵周期 168h，丙酸浓度为 49.66 g/L，产酸速率为 0.30g/L·h，较出发菌株 P-0 提高了 53.04%；7L 发酵罐实验表明，菌株 P-10 发酵周期 168h，丙酸浓度为 55.63g/L，产酸速率 0.33g/L·h。同时对菌株 P-10 做二次接种实验，结果表明，84h 为二次接种最适时间段，且 84h 进行二次接种时，丙酸浓度提高了 17.77%，二次接种实验不但有利于有机酸的积累，而且可以提高菌株的产酸能力和耐酸能力；经过选育的菌株 P-10 具有优良的产酸稳定性，有利于菌种的工业化生产和应用，同时对后续的发酵分离耦合具有重要意义。

关键词：产酸丙酸杆菌;丙酸;压力筛选;二次接种

Screening and Application of Acid-resistant Strains of *Propionibacterium acidipropionici*

SUN Dan, XU Guo-xia, WANG Zi-qiang, WANG Yun-shan, ZHANG Li-ping, SU Zhi-guo

(1 College of Life Science Hebei University, Baoding Hebei 071002, China)

(2 The State Key Lab of Biochemical Engineering, The Institute of Process Engineering of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

Abstract: In order to relieve the inhibitory effect of the metabolites (propionic acid) on the growth of the cells during the production of propionic acid by microbial fermentation, the laboratory storage of *Propionibacterium acidipropionici* (Resistant to 30g/L propionic acid) P-0 as the original strain, a strain of P-10 with good acid-producing ability of 10g/L propionic acid was obtained by propionic acid pressure screening, which reduced the inhibitory effect of propionic acid on cell growth during fermentation.The strain P-10 was subjected to shake flask fermentation, the fermentation cycle was 168h, the concentration of propionic acid was 49.66g/L, the rate of acid production was 0.30 g/L·h, which was 53.04% higher than that of the strain P-0. The experiment of 7L fermentor showed that the fermentation period of the strain P-10 was 168h, the concentration of propionic acid was 55.63g/L, the acid production rate was 0.33g/L·h. At the same time, the second inoculation experiment was carried out on the strain P-10. The results showed that the optimum period was 84h, and the concentration of propionic acid increased by 17.77% at the second time. The secondary inoculation experiment was not only beneficial to the organic acid but also can improve the acid production capacity and acid resistance of the strains. The tested strain P-10 has excellent acidic stability, which is beneficial to the industrial production and application of the strain and is of great significance to the subsequent fermentation separation and coupling.

基金项目：国家重点基础研究发展计划（973）基金资助项目（编号：2013CB733604），国家自然科学基金资助项目（编号：21506227）

通讯作者：yswang@ipe.ac.cn

Key Words: *Propionibacterium acidipropionici*; Propionic acid; Pressure screening; secondary inoculation

丙酸（Propionic Acid, PA）是一种用途广泛的天然有机弱酸，同时也是非常普遍的化工材料和饲料抗真菌剂[1-2]。丙酸主要的生产方法有化学合成和微生物发酵法[3]，化学合成要求的条件比较苛刻且成本较高，同时会带来一定的环境问题，因此微生物发酵法生产丙酸这一比较环保的生产方式，得到了越来越多的关注[4]。

微生物发酵法生产丙酸，会产生丙酸、乙酸和丁二酸[5]，有机酸的积累会抑制菌体的生长，从而影响其发酵水平，因此筛选丙酸杆菌优良耐酸菌株对工业化生产和后续发酵分离耦合具有重要意义[6-7]。Zhu YF 等[8]通过逐级传代的方式，逐渐提高选择压力(丙酸浓度)的方法来提高丙酸杆菌的耐酸性能，以甘油作为碳源，发酵周期 220h，产酸 44.62g/L。陈焕蛟等[9]通过压力筛选方法得到一株菌株，菌株发酵 240 h 时的产酸浓度为 49.35 g/L，这两种发酵周期长且产酸浓度不够高。另外，也可通过改变发酵模式提高产量，如 Coronado 等[10]设计了固定化丙酸杆菌细胞在搅拌式发酵罐中发酵过程的动力学模型；梁泽鑫等[11]采用 FBB 固定化补料流加发酵工艺，经过 400h 的驯化，丙酸产量达到 80.86g/L；Feng X 等[12]发明了一种多点式纤维床反应器作为丙酸的固定化发酵，发酵 496h，获得丙酸最高的浓度是 67.05g/L。但这些法发酵周期较长，产酸速率很低，不适宜工业化生产和应用。

文献报道表明，通过压力筛选的方法进行菌种选育是可行的[6-7]。为了进一步提高丙酸的发酵水平以及菌株的产酸耐酸能力，本研究以实验室保藏的产酸丙酸杆菌（耐 30g/L 丙酸）为出发菌株，采用逐级传代的方式，逐渐提高选择压力（丙酸浓度）的方法来提高丙酸杆菌的耐酸性能，选育出一株耐受丙酸的产酸丙酸耐酸菌株，降低了发酵过程中丙酸的反馈抑制作用。一方面有利于有机酸的积累，提高菌株的发酵水平，另一方面也降低了微生物发酵生产丙酸的成本，有利于菌种的工业化生产和应用，同时对后续的发酵分离耦合具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株

产酸丙酸杆菌（*Propionibacterium acidipropionici*）

1.1.2 培养基

种子培养基（g/L）：葡萄糖 35，玉米浆 21(干物)，$(NH_4)_2SO_4$ 5，K_2HPO_4 4，pH 7.0，121℃灭菌 20 min。

发酵培养基（g/L）：葡萄糖 80，玉米浆 50(干物)，酵母浸膏 5，K_2HPO_4 4.6，pH 7.0，121℃灭菌 20 min；葡萄糖单独灭菌。

固体培养基（g/L）：葡萄糖 20，玉米浆 10(干物)，$(NH_4)_2SO_4$ 2，调节 pH 7.0 后添加 $CaCO_3$ 2，琼脂 20；121℃灭菌 20 min。

1.1.3 实验设备与分析仪器

LA-20A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司)，PL203 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)，Delta 320 型 pH 计(瑞士梅特勒-托利多公司)，i7 紫外分光光度计(济南海能仪器股份有限公司)，SBA-40A 型生物传感分析仪(山东省科学院生物研究所)，ZXDP-B2160 全自动新型电热培养箱(上海智城分析仪器制造有限公司)，LDZM-80KCS 型立式蒸汽压力灭菌器(上海申安医疗器械厂)，TGL-20M 台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)，7 L 全自动搅拌式发酵罐(上海百仑生物科技有限公司).

1.2 实验方法

1.2.1 菌种筛选

将实验室保藏的产酸丙酸杆菌（耐 30g/L 丙酸）接种于种子培养基中，30℃厌氧培养 48 h 时，涂布固体培养皿，将培养皿置于厌氧盒，30℃厌氧培养 4d 时，挑取培养皿上长势较大的单菌落接种于斜面培养基，30℃厌氧培养 4d，保藏备用。

将斜面保存的产酸丙酸杆菌菌株用种子液体培养基洗下，接入种子培养基中，30℃厌氧培养 48h 时。以 10% 的接种量接入到含 5g/L 丙酸的种子培养基中，30℃厌氧培养 48h 时。再以 10%的接种量接入含更高浓度丙酸的种子培养基中 30℃厌氧培养 48h，通过不断提高丙酸浓度依次以 10%的接种量进行传代培养，筛选出具有优良耐酸性能的产酸丙酸杆菌菌株，如图 1 所示。

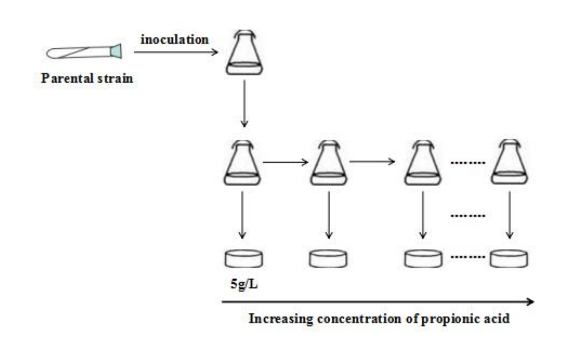


图 1 丙酸杆菌耐酸菌株的筛选

Fig.1 Screening of the acid-resistant stains of *Propionibacterium*

1.2.2 摇瓶发酵

将出发菌株和筛选的耐酸菌株分别接至种子培养基中，30℃厌氧培养 48h 时，以 10%的接种量转接到二级种子中 30℃厌氧培养 48h 时，再以 10%的接种量转接到发酵培养基中，采用生物传感分析仪测发酵中葡萄糖的浓度，当葡萄糖浓度低于 10 g/L 时补加葡萄糖，以维持菌体的正常生长和产物的合成，同时，用氨水调节 pH 为 6.8-7.2，发酵过程中定期取样检测发酵液中的丙酸产量，比较出发菌株和耐酸菌株的产酸能力和耐酸能力。

1.2.3 7L 发酵罐实验

7L 发酵罐放大培养，以出发菌株 P-0 为对照组，耐酸菌株 P-10 为实验组，控制搅拌速率为 50 r/min，30℃厌氧发酵，采用生物传感分析仪测发酵中葡萄糖的浓度，当葡萄糖浓度低于 10 g/L 时补加葡萄糖，以维持菌体的正常生长和产物的合成，同时，用氨水调节 pH 为 6.8-7.2，定时取样测菌体的生长和产酸浓度，比较出发菌株和耐酸菌株的产酸能力。

1.2.4 耐酸菌株产酸稳定性试验

将上述耐酸筛选的菌株在发酵过程中传代培养，分两种：发酵培养基添加 10g/L 丙酸和发酵培养基不添加丙酸，在培养到 48h 时以 10%的接种量转接到下一代，依次传代。采用生物传感分析仪测发酵中葡萄糖的浓度，当葡萄糖浓度低于 10 g/L 时补加葡萄糖，以维持菌体的正常生长和产物的合成，同时，用氨水调节 pH 为 6.8-7.2，定时取样测产酸浓度。

1.2.5 二次接种实验

出发菌株和耐酸菌株在摇瓶发酵分别到 84h 和 156h 时，以 10％的接种量进行二次接种，发酵过程中用氨水调节 pH 为 6.8-7.2，定时取样测产酸浓度，比较

出发菌株和耐酸菌株的产酸耐酸能力。

1.3 分析方法

1.3.1 生物量的测定

采用光密度法测定菌体的生物量：用 i7 型紫外分光光度计在 600nm 的波长条件下，用去离子水稀释一定的倍数，使 A600=0.3-0.8，用分光光度计测定。菌液生物量 OD_{600}=n×A600，n 表示菌液的稀释倍数。

1.3.2 葡萄糖浓度的测定

采用 SBA-40A 型生物传感分析仪测定葡萄糖的浓度：将发酵液进行离心，取 1mL 上清液用去离子水稀释 100 倍，进样测葡萄糖含量，进样量 25 μL。

1.3.3 丙酸浓度的测定

使用高效液相色谱法（HPLC）：流动相为 0.005mol/L H_2SO_4，流速 0.4mL/min，柱温 55℃，进样量 10μL。

2 结果与讨论

2.1 耐酸菌株筛选

出发菌株经过在液体种子培养基活化后，以 10%的接种量依次转接，随着培养基中添加丙酸浓度的增加菌体的生长受到了抑制，其菌体生长的结果如图 2 所示。

由图 2 可以看出，当培养基添加 30g/L 丙酸时几乎无菌体生长，培养基添加 25g/L 丙酸时菌体的 OD 值小于 4，添加 10g/L、15g/L 和 20g/L 丙酸的菌体 OD 值都大于 4，且由于添加 15g/L 和 20g/L 丙酸的菌株在丙酸压力条件下菌体生长较为缓慢，添加 5g/L 丙酸时，添加浓度过小，达不到耐酸效果，因此，选择培养基添加 10g/L 丙酸的菌株进行后续的发酵培养及应用，命名为 P-10。

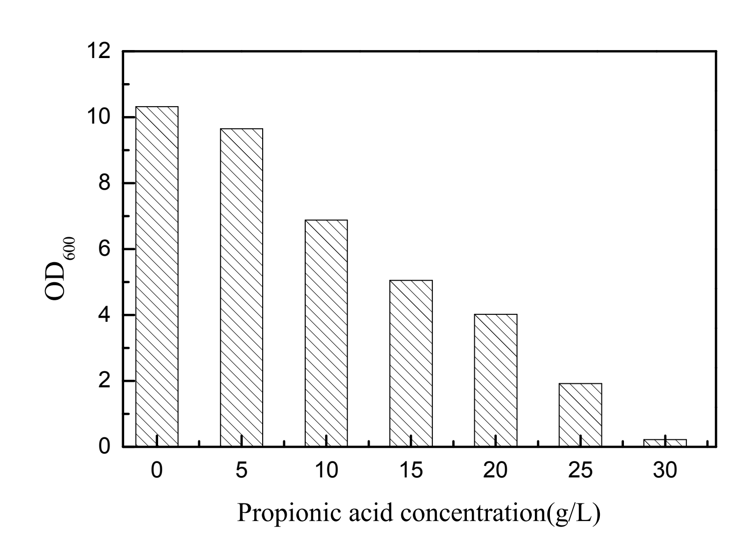


图 2 丙酸压力筛选过程菌体的生长状况

Fig.2 The growth status of bacteria in the process of propionic acid pressure screening

2.2 摇瓶发酵

耐酸菌株 P-10 做摇瓶发酵，发酵周期为 168h，同时与出发菌株 P-0 做比较，检测其产酸浓度和产酸速率，如表 1 所示，发酵终点 168h 时，耐酸菌株 P-10 的丙酸浓度为 49.66g/L，产酸速率为 0.30 g/L·h，比出发菌株 P-0 丙酸浓度高 53.04%。

表 1 摇瓶发酵产酸结果

Table 1 The results of the shaking flask fermentation to produce acid

Strains	P-0	P-10
Propionic acid concentration（g/L）	32.45	49.66
Acid production rate（g/L·h）	0.19	0.30

2.3 7L 发酵罐发酵

7L 发酵罐搅拌速率为 50r/min，温度 30℃，pH 为 6.8-7.0，耐酸菌株 P-10 和出发菌株 P-0 在发酵过程中的相关参数变化如图 3（a）和图 3（b）所示，出发菌株 P-0 发酵到 168h 丙酸浓度为 36.53g/L，产酸速率 0.22 g/L·h，而耐酸菌株 P-10 培养到 96h 葡萄糖消耗速率较快且产酸浓度为 46.23g/L，产酸速率 0.48g/L·h。发酵到 168h 时菌体生长到稳定期葡萄糖消耗速率缓慢，菌体生长稳定且产酸没有明显的增加，丙酸浓度为 55.63g/L，产酸速率 0.33 g/L·h，较出发菌株 P-0 提高了 52.33%。

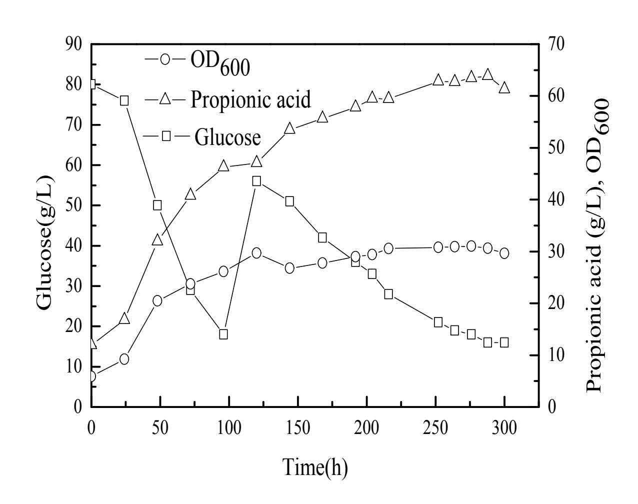


图 3（a）P-10 分批补料发酵过程中相关参数的变化

Fig.3(a) Changes of related parameters in P-10 batching filling material fermentation process

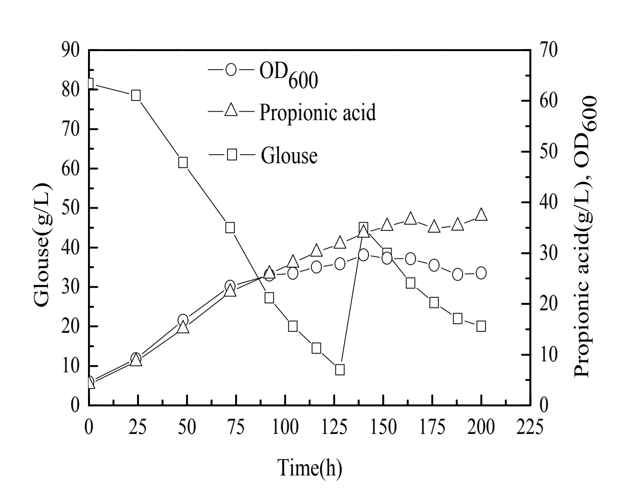


图 3（b）P-0 分批补料发酵过程中相关参数的变化

Fig.3(b) Changes of related parameters in P-0 batching filling material fermentation process

2.4 P-10 产酸稳定性试验

将耐酸菌株 P-10 在发酵过程中进行传代培养，同时测定 P-10 在培养基添加 10g/L 丙酸与培养基未添加丙酸两种情况下的产酸情况，实验结果表明菌株 P-10 在培养基添加 10g/L 丙酸和未添加丙酸两种环境中都能够连续传代 8 次，且每代产酸并没有显著的变化，表 2 结果证明菌株 P-10 具有优良的产酸稳定性。

表 2 耐酸菌株产酸稳定性试验

Table 2 Acidic stability test of acid-resistant strains

Propionic acid Concentration (g/L)	Generations of propagation							
	F_1	F_2	F_3	F_4	F_5	F_6	F_7	F_8
A	52.27	54.43	55.21	51.50	51.83	55.21	50.53	52.91
B	49.66	55.88	52.76	53.79	51.91	52.42	54.04	49.37

注：1) F 表示传代次数；

2) A 表示培养基添加丙酸；

3) B 表示培养基未添加丙酸。

2.5 二次接种实验

将耐酸菌株 P-10 摇瓶发酵分别到 84h 和 156h 时以 10%的接种量进行二次接种，同时以出发菌株 P-0 作为对照组，发酵过程中用氨水调节 pH 为 6.8-7.2，定时取样测产酸浓度，并持续发酵，发酵终点产酸结果如表 3。

表 3 P-0 和 P-10 二次接种实验

Table 3 P-0 and P-10 secondary inoculation experiment

	Strains					
	P-0			P-10		
Secondary inoculation time	No second inoculation	84h second inoculation	156h second inoculation	No second inoculation	84h second inoculation	156h second inoculation
Propionic acid Concentration (g/L)	31.74	34.51	32.71	51.29	60.39	54.35

由表 3 可以看出，P-10 在 84h 二次接种的终点产酸浓度为 60.39g/L，产酸最高，证明了 84h 为二次接种最适时间段，同时对照组 P-0 的产酸也证明了 84h 为二次接种最适时间段。

由图 4 可以显著看出，84h 二次接种时，耐酸菌株 P-10 比出发菌株 P-0 发酵终点产酸浓度高 74.99%，进一步验证了耐酸菌株 P-10 的应用前景。二次接种实验对菌株产酸浓度有一定的影响，能够延长菌株的产酸周期，提高菌株的产酸能力和耐酸能力，更有利于有机酸的积累，另一方面也降低生产成本，有利于菌种的工业化生产和应用，同时对后续的发酵分离耦合具有重要意义。

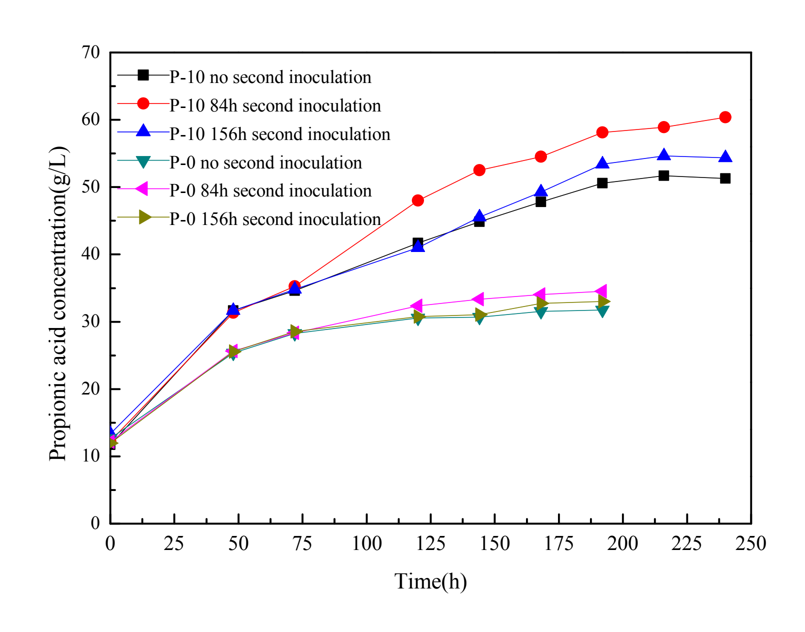


图 4 P-0 和 P-10 二次接种实验

Fig.4 P-0 and P-10 secondary inoculation experiment

3 结 论

以实验室保藏的产酸丙酸杆菌（耐 30g/L 丙酸）为出发菌株 P-0，通过压力筛选的方法，筛选出一株具有优良产酸耐酸性能的菌株 P-10，同时，得到以下结论：

（1）筛选出了一株耐受 10g/L 丙酸的产酸丙酸杆菌菌株 P-10，其产酸浓度为 49.66g/L，较出发菌株 P-0 提高了 53.04%。

（2）7L 发酵罐实验结果表明，菌株 P-10 的发酵周期为 168h 时，丙酸浓度可达到 55.63g/L，丙酸产率为 0.33g/(L·h)，较出发菌株 P-0 提高了 52.33%。

（3）产酸丙酸杆菌耐酸菌株 P-10 具有优良的产酸稳定性，摇瓶传代 8 次后，其产酸没有明显变化。

（4）产酸丙酸杆菌耐酸菌株 P-10 具有良好的应用前景。当发酵进行至 84h 时，进行二次接种，发酵结束时丙酸浓度可达到 60.39g/L，较批次发酵时提高了 17.77%。此外，84h 二次接种时，耐酸菌株 P-10 比出发菌株 P-0 发酵终点产酸浓度高 74.99%，进一步验证了耐酸菌株 P-10 的应用前景。

产酸丙酸杆菌在发酵过程中有机酸的积累会抑制菌体的生长，从而影响其发酵水平。筛选出的耐酸菌株 P-10 具有优良的产酸稳定性，且耐酸菌株 P-10 在二

次接种实验中能够延长菌株的产酸周期，提高菌株的产酸能力和耐酸能力，更有利于有机酸的积累，提高了菌株的发酵水平，另一方面也降低了生产成本，有利于菌种的工业化生产和应用，同时对后续的发酵分离耦合具有重要意义。

参考文献:

[1] 叶文彬, 郑毅. 产酸丙酸杆菌 FS1026 丙酸发酵的研究. 福建: 福建师范大学. 2015(06)

Ye W B, Zheng Y. Studies on the Propionic Acid Fermentation from *Propionibacterium acidipropionici* FS1026. FuJian: FuJian Normal University. 2015(06)

[2] Suwannakham S, Huang Y, Yang S T. Construction and characterization of ack knock-out mutants of *Propionibacterium acidipropionici* for enhanced propionic acid fermentation. Biotechnology and Bioengineering. 2006, 94(2): 383-395

[3] 孙帅, 常忠义, 唐学明, 等. 丙酸杆菌代谢物摇瓶补料分批发酵条件研究. 西北农林科技大学学报(自然科学版). 2011, 39(7): 135-140

Sun S, Chang Z Y, Tang X M, et al. Study of *Propionibacterium* metabolites flask fed-batch fermentation. Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition). 2011, 39 (7): 135-140

[4] Jiang L, Wang J F, Liang S Z, et al. Enhanced butyric acid tolerance and bioproduction by Clostridium tyrobutyricum immobilized in a fibrous bed bioreactor. Biotechnology and Bioengineering, 2011, 108(1): 31-40

[5] 梁泽鑫, 王菊芳. 产酸丙酸杆菌生长特性及 5L 罐发酵动力学研究. 激光生物学报, 2014(03)

Liang Z X, Wang J F. The Growth and 5L Fermentor Kinetics Characteristics of *Propionibacterium acidipropionici*. Journal of Laser Biology, 2014(03)

[6] Goswami V, Srivastava A K. Fed-batch propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici*. Biochemical Engineering Journal. 2000, 4(2): 121-128

[7] Karadag D, Puhakka J A. Direction of glucose fermentation towards hydrogen or ethanol production through online pH control. International Journal of Hydrogen Energy, 2010, 35: 10245 -10251

[8] Zhu Y F, Liu L, Li J H , et al. Optimization and Scale-up of Propionic Acid Production by Propionic Acid-tolerant *Propionibacterium acidipropionici* with Glycerol as the Carbon Source. Bioresource Technology, 2010, 101(22): 8902-8906

[9] 陈唤蛟，李小连，李彦良，等. 丙酸高产菌株的选育及发酵培养基优化. 过程工程学报, 2014, 14(3): 482-486

Chen H J, Li X L, Li Y L, et al. Screening of high yield propionic acid producing strain and optimization of its fermentation medium. Journal of Process Engineering, 2014, 14 (3): 482-486

[10] Coronado C, Botello J E, Herrera F. Study and mathematical modeling of the production of propionic acid by *Propionibacterium acidipropionici* immobilized in a stirred tank fermentor. Biotechnology Progress, 2001, 17(4): 669-675

[11] 梁泽鑫，王菊芳. 利用纤维床生物反应器发酵廉价生物质生产丙酸的研究. 广州：华南理工大学. 2012: (01)

Liang Z X, Wang J F. Study on the Production of Propionic Acid by Fermentation of Cheap Biomass Using Fiber Bed Bioreactor. Guangzhou: South China University of Technology. 2012: (01)

[12] Feng X, Chen F, Xu H, et al. Propionic acid fermentation by *Propionibacterium freudenreichii CCTCC M207015* in a multi-point fibrous-bed bioreactor. Bioprocess and Biosystems Engineering. 2010, 33(9): 1077-1085